

## **ИНФЕКЦИЯ**

### ***APHANOMYCES INVADANS***

### **(ЭПИЗООТИЧЕСКИЙ ЯЗВЕННЫЙ СИНДРОМ)**

---

#### **1. Предмет рассмотрения<sup>1</sup>**

В контексте данной главы инфекция *Aphanomyces invadans* означает все инфекции, вызываемые грибом класса оомицетов *A. invadans* (син. *A. piscicida*).

#### **2. Информация о болезни**

##### **2.1. Факторы возбудителя**

###### **2.1.1. Этиологический возбудитель, штаммы возбудителя**

Инфекция *A. invadans* – это сезонное эпидемическое заболевание большой значимости у диких и разводимых на ферме пресноводных и эстуарных рыб. Имеет сложную инфекционную этиологию и клинически характеризуется наличием инвазивной инфекции *A. invadans* и некротизирующими язвенными поражениями, как правило, вызывающими гранулематозную реакцию. Инфекция *A. invadans* наиболее широко известна как эпизоотический язвенный синдром (ЭЯС, EUS). Она также известна как болезнь красных пятен, грибковый гранулематоз и язвенный микоз. В 2005 году ученые предложили именовать данную болезнь эпизоотическим гранулематозным афаномикозом (Baldock с соавт., 2005); тем не менее, термин ЭЯС (EUS) по-прежнему используется большинством ученых. Вызывает болезнь гриб класса оомицетов *A. invadans*. Инфекция *Aphanomyces invadans* получила широкое распространение со времени первой вспышки, произошедшей в 1971 году в Японии, и на сегодняшний день зарегистрирован только один генотип. С отдельными вспышками также были связаны паразиты и рабдовирус, а вторичные грамотрицательные бактерии неизбежно инфицируют поражения, вызванные *A. invadans*.

Род *Aphanomyces* входит в состав группы организмов, широко известных как водяная плесень. Несмотря на то, что ее долго считали относящейся к грибам из-за характерного роста в виде нитевидных структур, данная группа, Oomycetida, не относится к Eumycota, но вместе с диатомами и бурыми водорослями классифицируется как группа под названием Stramenopiles или Chromista.

###### **2.1.2. Выживание вне хозяина**

Каким образом *A. invadans* выживает вне хозяина, все еще неясно. Если подвижная зооспора не сможет найти подходящие субстраты, она инцистируется. Метода, подходящего для того, чтобы выделить или изолировать инцистированную зооспору

---

<sup>1</sup> NB: Версия, принятая Всемирной ассамблеей делегатов МЭБ в мае 2013 года.

из пораженных рыбоводных прудов, нет. В течение какого времени инцистированная спора может выживать в воде или на нерыбном субстрате, все еще неясно. При проведении эксперимента *in-vitro* инцистированная зооспора продолжала существовать в течение по меньшей мере 19 дней (Lilley et al., 2001).

### **2.1.3. Стабильность возбудителя (эффективные методы инактивации)**

*Aphanomyces invadans* лучше всего растет при температуре 20–30°C; он не растет в условиях *in vitro* при температуре 37°C. При солености воды выше 2 частей на тысячу (ppt) распространение возбудителя может остановиться. Подготовка рыбоводных прудов путем просушивания солнцем и известкования являются эффективными методами дезинфекции против *A. invadans*. Как и в случае с другими оомицетами или разновидностями водяной плесени, дезинфицирующие химические средства общего назначения эффективно уничтожают любых *A. invadans*, которые могут контаминировать фермы, рыбоводные пруды или рыболовные снасти.

### **2.1.4. Жизненный цикл**

*Aphanomyces invadans* (Saprolegniales, Oomycetes) имеет несептированную грибоподобную структуру мицелия. У данного оомицета есть две типичные формы зооспор. Первичная зооспора состоит из круглых клеток, которые развиваются внутри спорангия. Первичная зооспора выходит на кончик спорангиума, где она формирует кластер спор. Она быстро трансформируется во вторичную зооспору, которая имеет почкообразную форму, с клетками, имеющими два латеральных жгутика, и может свободно плавать в воде. Вторичная зооспора остается подвижной в течение периода времени, продолжительность которого зависит от условий окружающей среды и наличия рыбы-хозяина или субстрата. Как правило, зооспора инцистируется и прорастает, производя новые гифы, хотя в дальнейшем из цист могут выходить третичные поколения зооспор (полипланетизм) (Lilley с соавт., 1998).

## **2.2. Факторы хозяина**

### **2.2.1. Восприимчивые виды-хозяева**

*Aphanomyces invadans* является причиной болезни и смертности у разводимых на ферме и диких рыб по всем миру. Примерно 94 вида рыб, как подтверждено данными гистологической диагностики, естественным образом поражаются *A. invadans*, как показано в Таблице 2.1. По поводу подозрительных случаев естественной инфекции *A. invadans* у видов помимо перечисленных следует немедленно обращаться в соответствующую Референтную лабораторию МЭБ вне зависимости от того, ассоциируются ли клинические признаки с полученными результатами или нет. Некоторые рыбы, как, например, сазан (каarp обыкновенный) (*Cyprinus carpio*), нильская тиляпия (*Oreochromis niloticus*) и ханос (молочная рыба) (*Chanos chanos*), были сочтены естественными резистентными к инфекции *A. invadans* (Lilley с соавт., 1998).

Таблица 2.1. Виды рыб, восприимчивые к инфекции *Aphanomyces invadans*

Научное наименование	Общепринятое наименование	Научное наименование	Общепринятое наименование
<i>Acanthopagrus australis</i>	желтоперый лещ	<i>Macquaria ambigua</i>	золотой окунь
<i>Acanthopagrus berda</i>	черный морской карась	<i>Macquaria novemaculeata</i>	австралийский басс
<i>Alosa sapidissima</i>	американская шэд	<i>Marcusenius macrolepidotus</i>	рыба-бульдог
<i>Ambassis agassiz</i>	австралийская чанда (окунь Агассица)	<i>Melanotaenia splendida</i>	радужница горбатая
<i>Ameiurus melas</i>	черный сомик	<i>Micralestes acutidens</i>	острозубый микралест
<i>Ameiurus nebulosus</i>	американский карликовый сомик	<i>Micropterus salmoides</i>	большеротый окунь
<i>Amniataba percoides</i>	ленточная амниатаба	<i>Mugil cephalus</i>	черная кефаль или лобан
<i>Anabas testudineus</i>	рыба-ползун	<i>Mugil curema</i>	белая кефаль
<i>Archosargus probatocephalus</i>	рыба-каторжник («овечья голова»)	<i>Mugilidae</i> ( <i>Mugil</i> spp.; <i>Liza</i> spp.)	кефалевые
<i>Arius</i> sp.	морской сом	<i>Muxus petardi</i>	кефаль
<i>Aseraggodes macleayanus</i>	морской язык (солея)	<i>Nematalosa erebi</i>	австралийская нематалоза
<i>Bairdiella chrysoura</i>	горбыли или крокеры (бэрдиелла)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	радужная форель
<i>Barbus paludinosus</i>	барбус палудиносус	<i>Oreochromis andersoni</i>	ореохром Андерсона
<i>Barbus poechnii</i>	барбус Печи	<i>Oreochromis macrochir</i>	большегрудый ореохром
<b><i>Barbus thamalakanensis</i></b>	<b>Thamalakane barb</b>	<i>Osphronemus goramy</i>	гигантский гурами
<i>Barbus unitaeniatus</i>	барбус меднополосый	<i>Oxyeleotris lineolatus</i>	спящий элеотр
<i>Bidyanus bidyanus</i>	серебряный окунь	<i>Oxyeleotris marmoratus</i>	мраморный элеотр
<i>Brevoortia tyrannus</i>	атлантическая менхэден	<i>Petrocephalus catostoma</i>	розовый петроцефал
<i>Brycinus lateralis</i>	черноспинный брицин	<i>Platycephalus fuscus</i>	бурый плоскоголов
<i>Carassius auratus auratus</i>	золотая рыбка	<i>Plecoglossus altivelis</i>	аю
<i>Catla catla</i>	катля	<i>Pogonias cromis</i>	бородатый тёмный горбыль (барабанщик)
<i>Channa marulius</i>	белопятнистый змееголов (змееголов-марулий)	<i>Psettodes</i> sp.	псеттод
<i>Channa striatus</i>	полосатый змееголов	<i>Puntius gonionotus</i>	серебряный барбус
<i>Cirrhinus mrigala</i>	мригаль	<i>Puntius sophore</i>	барбус софоре
<i>Clarias gariepinus</i>	южноафриканский кларий	<b>Rohtee sp.</b>	<b>keti-Bangladeshi</b>

Таблица 2.1. Виды рыб, восприимчивые к инфекции *Aphanomyces invadans*

Научное наименование	Общепринятое наименование	Научное наименование	Общепринятое наименование
<i>Clarias ngamensis</i>	кларий Мелланда	<b><i>Sargochromis carlottae</i></b>	<b>rainbow bream</b>
<i>Clarias batrachus</i>	лягушковый клариевый сом (промысловый клариас)	<i>Sargochromis codringtonii</i>	парагиляпия Кодрингтона (зеленый (сарго)хромис)
<i>Colisa lalia</i>	лялиус (карликовый гурами)	<i>Sargochromis giardi</i>	саргохром Гиарда (розовый (сарго)хромис)
<i>Esomus</i> sp.	эзомус	<i>Scatophagus argus</i>	аргус пятнистый
<i>Fluta alba</i>	рисовый угорь	<b><i>Schilbe intermedius</i></b>	<b>silver catfish</b>
<i>Glossamia aprion</i>	мраморная глоссамия	<i>Schilbe mystus</i>	южноафриканский шильбовый сом
<b><i>Glossogobius giuris</i></b>	<b>bar-eyed goby</b>	<i>Scleropages jardini</i>	розовочешуйный склеропаг (жемчужная арована Джардини)
<i>Glossogobius</i> sp.	глоссогобиус	<i>Scortum barcoo</i>	терапон барку (нефритовый окунь)
<i>Helostoma temmincki</i>	целующийся гурами	<i>Selenotoca multifasciata</i>	пятнистополосатый аргус
<i>Hepsetus odoe</i>	Африканская харациновая щука (хепсетус)	<i>Serranochromis angusticeps</i>	узкоголовый хромис
<i>Hydrocynus vittatus</i>	обычная тигровая рыба	<i>Serranochromis robustus</i>	нембве
<i>Ictalurus punctatus</i>	канальный сом	<i>Sillago ciliata</i>	песчаная силлага
<i>Kurtus gulliveri</i>	гулливеров куртус	<i>Siluridae (pod)</i>	сомы
<i>Labeo cylindricus</i>	африканский вальковатый лабео	<i>Strongylura krefftii</i>	клькастый сарган («Длинный Том»)
<i>Labeo lunatus</i>	лунный лабео	<i>Therapon</i> sp.	терапон
<i>Labeo rohita</i>	роху	<i>Tilapia rendalli</i>	тиляпия Рендалла
<i>Lates calcarifer</i>	баррамунди или морской окунь	<i>Tilapia sparrmanii</i>	чернополосая тилапия
<i>Leiopotherapon unicolor</i>	крапчатый окунь	<i>Toxotes chatareus</i>	оливковый брызгун
<i>Lepomis macrochirus</i>	синежаберный солнечник	<i>Toxotes lorentzi</i>	брызгун Лоренца
<i>Lutjanus argentimaculatus</i>	красный луциан	<i>Trichogaster pectoralis</i>	змеевидный гурами
<i>Macchullochella peelii</i>	треска Мюррея	<i>Trichogaster trichopterus</i>	гурами пятнистый
<i>Maccullochella ikei</i>	восточная пресноводная треска	<i>Tridentiger obscures obscures</i>	темный трехзубый бычок

### 2.2.2. Восприимчивые стадии развития хозяина

Восприимчивые стадии развития рыб – это, как правило, молодь и подростящая молодь. Сообщения об обнаружении инфекции *A. invadans* у мальков или личинок рыб отсутствуют.

При экспериментальном введении *A. invadans* сеголеткам индийского крупного карпа (катля, роху и мригаль) обнаружена резистентность к *A. invadans* (Pradhan с соавт., 2007), даже несмотря на то, что они являются естественно восприимчивыми видами. Экспериментальные заражения показали, что золотые рыбки являются восприимчивыми (Natai с соавт., 1977; Natai с соавт., 1994), а карп обыкновенный (Wada с соавт., 1996), нильская тилапия (Khan с соавт., 1998) и европейский угорь, *Anguilla anguilla*, (Oidtmann с соавт., 2008) являются резистентными.

### **2.2.3. Предрасположенность видов или субпопуляций (вероятность выявления)**

*Aphanomyces invadans* можно легко выявить при помощи гистологических методов с использованием образцов в виде больных рыб, отобранных из пораженных районов. Тем не менее, *A. invadans* можно выделить только от рыб с легкими или умеренно выраженными клиническими признаками инфекции *A. invadans*, демонстрирующих красные пятна или небольшие язвы. Рыбы с ярко выраженными клиническими признаками или крупными язвами не подходят для выделения.

### **2.2.4. Целевые органы и инфицируемые ткани**

Подвижная зооспора играет важную роль в распространении болезни. После того, как подвижная спора прикрепится к коже рыбы, спора, при наличии подходящих условий, прорастет, и ее гифы захватят кожу рыбы, мышечные ткани и достигнут внутренних органов. Скелетные мышцы рыбы являются целевым органом и демонстрируют основные клинические признаки инфекции *A. invadans* с грибковыми гранулемами.

### **2.2.5. Персистентная инфекция пожизненными носителями**

Информация, указывающая на то, что рыбы могут быть пожизненными носителями *A. invadans*, отсутствует. Как правило, большинство инфицированных рыб погибает во время вспышки. Хотя некоторые рыбы с легкой или умеренной формами инфекции могли выздороветь, маловероятно, чтобы они были пожизненными носителями *A. invadans*.

### **2.2.6. Переносчики**

Данные отсутствуют.

### **2.2.7. Известные или подозреваемые дикие водные животные-носители**

Данные отсутствуют.

## **2.3. Картина болезни**

### **2.3.1. Механизмы передачи**

Инфекция *A. invadans* передается по горизонтали. Зооспоры *A. invadans* могут

передаваться горизонтально от одной рыбы к другой через воду. Считается, что только вторичные зооспоры или зооспоры на стадии свободного плавания способны прикрепляться к поврежденной коже рыбы и прорасти гифами. Если вторичные зооспоры не могут найти восприимчивый вид или сталкиваются с неблагоприятными условиями, они могут инцистироваться в условиях пруда. Цисты могут подождать наступления условий, благоприятных для их трансформации в третичные поколения зооспор, которые также находятся в стадии свободного плавания. Инцистирование, характерная особенность *A. invadans*, может играть важную роль в цикле вспышек в эндемичных районах.

### **2.3.2. Превалентность**

Превалентность инфекции *A. invadans* в дикой природе и на аквакультурных фермах может быть высокой в эндемичных районах, когда наблюдаются высокие уровни смертности, однако может значительно варьировать. Имеются весьма ограниченные данные относительно превалентности болезни или инфекции при других обстоятельствах. Бесконтрольный водообмен на рыбных фермах в эндемичных районах приведет к вспышкам инфекции *A. invadans* на большинстве ферм, где разводят восприимчивые виды рыб.

### **2.3.3. Географическое распространение**

Инфекция *A. invadans* была впервые зарегистрирована у разводимых на ферме пресноводных аю (*Plecoglossus altivelis*) в префектуре Оита (остров Кюсю, Япония) в 1971 году (Egusa & Masuda, 1971). Позже она была зарегистрирована у эстуарных рыб, в частности, у черной кефали (*Mugil cephalus*) в восточной части Австралии в 1972 году (Fraser с соавт., 1992; McKenzie & Hall, 1976). Инфекция *A. invadans* распространилась через Папуа – Новая Гвинея на территорию Юго-Восточной и Южной Азии, а также Западной Азии, где достигла Пакистана (Lilley с соавт., 1998; Tonguthai, 1985). Вспышки язвенной болезни у атлантической менхэден (*Brevoortia tyrannus*) в Соединенных Штатах Америки (США) были связаны с тем же самым этиологическим возбудителем, что и болезнь, наблюдавшаяся в Азии (Blazer с соавт., 1999; Lilley с соавт., 1997a; Vandersea с соавт., 2006). Первые подтвержденные вспышки инфекции *A. invadans* на африканском континенте произошли в 2007 году в Ботсване, Намибии и Замбии и были связаны с системой рек Замбези-Чобе (ФАО, 2009). В 2010 и 2011 годах инфекция *A. invadans* появилась у диких пресноводных рыб в Западно-Капской провинции (Южная Африка) и у диких американских карликовых сомов в озере Онтарио в провинции Онтарио (Канада). Сообщения об инфекции *A. invadans* поступали из более чем 20 стран, расположенных на четырех континентах: Северная Америка, южная часть Африки, Азия и Австралия.

### **2.3.4. Смертность и заболеваемость**

Когда инфекция *A. invadans* заражает рыбоводный пруд, как, например, пруд для разведения змееголова, может наблюдаться высокий уровень заболеваемости (>50%) и смертности (>50%) в годы с длительным холодным периодом с температурой воды от 18 до 22°C. Однако уровни смертности и заболеваемости могут сильно варьировать в зависимости от вида рыб. Некоторые инфицированные рыбы могут

выздороветь по окончании холодного периода.

### **2.3.5. Факторы окружающей среды**

Инфекция *A. invadans* происходит в большинстве случаев при температуре воды 18–22°C и после периодов проливных дождей (Bondad-Reantaso с соавт., 1992). Такие условия способствуют споруляции *A. invadans* (Lumanlan-Mayo с соавт., 1997), а температура 17–19°C, как было показано, замедляет развитие воспалительной реакции рыб на инфекцию оомицетом (Catar & Munday, 1998; Chinabut с соавт., 1995). В некоторых странах вспышки происходят сначала среди диких рыб, а затем распространяются на рыбоводные пруды. При обычных условиях инфицирование *A. invadans* методом ванн у здоровых восприимчивых видов рыб не вызывает клинических признаков болезни. Оомицету *A. invadans* требуется наличие предрасполагающих факторов, которые приводят к повреждению кожи, как, например, паразиты, бактериальная или вирусная инфекция, или кислая вода, чтобы вызвать клинические признаки заболевания ЭЯС (Lilley с соавт., 1998).

Сообщения об инфекции *A. invadans* поступали из более чем 20 стран, расположенных на четырех континентах. Перемещение живых декоративных рыб из стран, неблагополучных по *A. invadans*, могло привести к распространению болезни, как это было в случае вспышки на территории Шри-Ланки (Balasuriya, 1994). Наводнение также повлекло за собой распространение ЭЯС на территории Бангладеш и Пакистана (Lilley с соавт., 1998). При возникновении вспышки в реках/каналах болезнь может распространяться вниз по течению, а также вверх по течению в случаях, когда имеются восприимчивые виды рыб. Обеспечение того, чтобы вода из инфицированных рек не контактировала с рыбоводными прудами, могло бы предотвратить распространение болезни.

## **2.4. Контроль и профилактика**

### **2.4.1. Вакцинация**

Вакцины, обладающей протективным действием, нет. Однако, иммунизация змееголовов сырым экстрактом *A. invadans* вызывала гуморальный иммунный ответ, как было установлено при помощи SDS-PAGE (электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия) и анализа методом Вестерн-блота (Thompson с соавт., 1997).

### **2.4.2. Химиотерапия**

Эффективного метода лечения рыбы, инфицированной *A. invadans*, в условиях дикой природы и в аквакультурных прудах не существует. Чтобы свести к минимуму потери рыбы в инфицированных рыбоводных прудах, следует прекратить водообмен и применить известь или гидратированную известь и/или соль (Lilley с соавт., 1998). Попытки использовать «зеленую воду», золу, известь и семена или ветки нима (*Azadirachta indica*) для профилактических обработок инфицированных *A. invadans* рыб в рыбоводных прудах давали неустойчивые результаты (Национальный научно-исследовательский институт по охране здоровья водных животных [AAHRI], Таиланд, внутренний отчет, 2001 год).

#### **2.4.3. Иммуностимуляция**

Предварительные эксперименты показали, что внутрибрюшинное введение иммуностимулятора, Salar-bes (содержащего 300 г кг<sup>-1</sup> витамина С, 150 г кг<sup>-1</sup> витамина В и следовые количества витаминов В1, В2, В6 и В12), змееголовам может усилить ингибирование как прорастания, так и роста зооспор в сыворотке *in vitro*. Змееголовы, питавшиеся обычным кормом в гранулах и кормом, обогащенным Salar-bes, все же демонстрировали клинические признаки инфекции *A. invadans* после контрольного заражения *A. invadans*. Однако, у змееголов, получавших иммуностимулятор, Salar-bes, отмечена относительная выживаемость (в процентном выражении) на 59,2% выше, чем у контрольной группы, получавшей обычный корм (Miles с соавт., 2001).

#### **2.4.4. Выведение резистентных особей**

Данные отсутствуют.

#### **2.4.5. Пополнение поголовья резистентными видами**

Некоторые важные аквакультурные виды, в том числе нильская тилапия, молочная рыба и китайский карп, как было продемонстрировано, являются резистентными к инфекции *A. invadans*, и их можно разводить в эндемичных районах. Рекомендуется вводить в поголовье резистентные индигенные виды рыб.

#### **2.4.6. Блокирующие агенты**

Данные отсутствуют.

#### **2.4.7. Дезинфекция икринок и личинок**

Текущая дезинфекция икринок и личинок рыб против различных видов водной плесени эффективна и в отношении *A. invadans*. Необходимо отметить, что сообщения о наличии *A. invadans* у икринок и личинок рыб отсутствуют.

#### **2.4.8. Общие практики ведения хозяйства**

Контроль *A. invadans* в природных водах, по всей вероятности, невозможен. При возникновении вспышек в небольших, закрытых водоемах или рыбоводных прудах известкование воды с использованием сельскохозяйственной извести и улучшение качества воды, наряду с удалением инфицированных рыб, часто является эффективным в плане сокращения количества случаев смертности и борьбы с болезнью. Исключение возможности просачивания воды из пораженных *A. invadans* мест в рыбоводные пруды – это обычная практика, позволяющая без труда предотвратить распространение на территорию ферм. Хлорид натрия или соль и сельскохозяйственная известь являются безопасными и эффективными химическими средствами для проведения обработок или предотвращения распространения *A. invadans*.

### **3. Отбор образцов**

#### **3.1. Выбор отдельных образцов**

Сачок, накидная сеть или невод являются самым лучшим выбором для вылавливания больных рыб в природных водах или рыбоводных прудах. В целях расследования вспышек, в качестве образцов следует отбирать больных рыб с язвенными поражениями или красными пятнами на теле.

### **3.2. Сохранение образцов в целях предоставления на исследование**

Образцы в виде рыб следует транспортировать в лабораторию живыми или в охлаждаемых льдом контейнерах для последующей диагностики. Рыб, отобранных в удаленных районах, следует анестезировать и можно фиксировать в обычном 10% формалине или 10% забуференном фосфатом формалине на по меньшей мере 1–2 дня. Фиксированные образцы затем переносят в двуслойные пластиковые пакеты с увлажненной формалином тонкой оберточной бумагой. Пакеты, содержащие влажные образцы, запечатывают и отправляют в лабораторию.

### **3.3. Объединение образцов в пул**

Десять больных особей рыб отбирают в качестве образцов с места, пораженного инфекцией *A. invadans*. Диагностику осуществляют посредством гистологического метода и выделения оомицета с использованием отдельных рыб или группы из нескольких рыб.

### **3.4. Наиболее подходящие органы или ткани**

Рекомендуется использовать рыб с менее выраженными клиническими признаками, а мышечная ткань, расположенная рядом с язвой или под ней, является наиболее подходящей для выделения оомицетов. Для гистопатологического исследования наилучшим образом подходит мышечная ткань по краю язвы.

### **3.5. Образцы/ткани, которые не подходят для исследования**

Для выделения оомицетов не подходят тяжело больные или мертвые рыбы.

## **4. Диагностические методы**

Диагностику инфекции *A. invadans* у рыб с клиническими поражениями можно осуществить посредством гистопатологии, выделения оомицетов или амплификации методом полимеразной цепной реакции.

### **4.1. Методы полевой диагностики**

Вспышки инфекции *A. invadans* были связаны с массовой смертностью различных видов пресноводных рыб в условиях дикой природы (включая рисовые поля, устья рек, озера и реки) и на фермах в периоды низких температур и после периодов проливных дождей.

#### **4.1.1. Клинические признаки**

Обычно у рыб появляются красные пятна или язвенные поражения, от небольших до крупных, на теле.

#### **4.1.2. Изменения в поведении**

Ранние признаки болезни включают потерю аппетита, также рыбы приобретают более темную окраску. Инфицированные рыбы могут плавать близко к поверхности воды и становятся гиперактивными, а их движения приобретают рывкообразный характер.

## **4.2. Клинические методы**

### **4.2.1. Макроскопическая патология**

На поверхности тела, на голове, жаберной крышке или хвостовом стебле наблюдаются красные пятна. На более поздних стадиях наблюдаются крупные неглубокие язвы красного или серого цвета, часто с некрозом коричневого оттенка. На боку или спине появляются крупные поверхностные поражения. Большинство видов, за исключением полосатых змееголовов и кефали, на этой стадии погибают. У высоковосприимчивых видов, таких как змееголов, поражения носят более обширный характер и могут привести к полной эрозии задней части тела или к некрозу как мягких, так и твердых тканей черепа, в результате чего у живого животного обнажается мозг.

### **4.2.2. Клиническая химия**

Информация отсутствует.

### **4.2.3. Микроскопическая патология**

Причиной поражений на ранней стадии является эритематозный дерматит без явного участия оомицета. Рост гиф *Aphanomyces invadans* наблюдается в скелетных мышцах по мере того, как поражение прогрессирует от активной фазы легкого хронического активного дерматита до тяжелого некротизирующего гранулематозного дерматита локального распространения с тяжелой формой зернистой дистрофии мышцы. Оомицет вызывает сильную воспалительную реакцию, и вокруг прорастающих гиф образуются гранулемы. Соскобы поражений с тела рыбы или язв, как правило, демонстрируют вторичную грибную, бактериальную и/или паразитическую инфекцию.

### **4.2.4. Влажные препараты**

Не подходят для диагностики инфекции *A. invadans*.

### **4.2.5. Мазки**

Не подходят для диагностики инфекции *A. invadans*.

### **4.2.6. Электронная микроскопия/цитопатология**

Не подходят для диагностики инфекции *A. invadans*.

## **4.3. Методы обнаружения и идентификации возбудителя**

### **4.3.1. Методы прямого обнаружения**

#### **4.3.1.1 Микроскопические методы**

Приготовление давленого препарата можно осуществить следующим образом:

- i) Удалите поверхность язвы при помощи острого лезвия скальпеля.
- ii) Отрежьте мышечную ткань по краю язвы.
- iii) Поместите кусочки ткани на разделочную доску, затем сделайте тонкие срезы при помощи острого лезвия скальпеля.
- iv) Поместите тонкие срезы ткани между двумя предметными стеклами и слегка сдавите их пальцами.
- v) Удалите одно из предметных стекол и накройте ткань покровным стеклом. Рассмотрите под световым микроскопом для обнаружения несептированной структуры гиф *A. invadans* (12–25 мкм в диаметре).

#### 4.3.1.1.1. Влажные препараты

Не подходят для диагностики инфекции *A. invadans*.

#### 4.3.1.1.2. Мазки

Не подходят для диагностики инфекции *A. invadans*.

#### 4.3.1.1.3. Фиксированные срезы

##### 4.3.1.1.3.1. Процедура отбора образцов

- i) Отберите образцы в виде только живых или умирающих особей рыб с клиническими поражениями.
- ii) Отберите образцы кожи/мышцы (<1 см<sup>3</sup>), включая переднюю кромку поражения и окружающую ткань.
- iii) Сразу же зафиксируйте ткани в 10% формалине. Количество формалина должно в 10 раз превышать объем фиксируемой ткани.

##### 4.3.1.1.3.2. Процедура гистологического исследования

Последующая обработка фиксированной ткани включает обезвоживание путем проведения через спирты возрастающей крепости, очистку в агенте, допускающем смешивание с воском, и импрегнацию воском. Из блоков, содержащих образцы ткани рыб, готовят срезы толщиной около 5 мкм и монтируют на предметное стекло. Перед окрашиванием срезы необходимо полностью освободить от воска и произвести окраску гематоксилином и эозином (H&E) (Chinabut & Roberts, 1999). Гематоксилин и эозин и общие красители для выявления грибов (например, окраска по Грокотту) позволяют выявить типичные гранулемы и инвазивные гифы.

### 4.3.1.2. Выделение и идентификация возбудителя

#### 4.3.1.2.1. Выделение *Arhanomyces invadans* из внутренних тканей

Ниже приведены два метода выделения *A. invadans* или *A. piscicida*, адаптированные на основе материалов Lilley с соавт., 1998 и Willoughby & Roberts, 1994.

#### 4.3.1.2.1.1. Метод 1

Лучше всего для опытов по выделению оомицетов подходят умеренно выраженные, имеющие бледный оттенок, выпуклые кожные поражения. Удалите чешуйки по периметру поражения и прижгите расположенную под ним кожу раскаленным докрасна шпателем для того, чтобы простерилизовать поверхность. С помощью стерильного лезвия скальпеля и стерильного остроконечного пинцета рассеките *stratum compactum* под прижатой областью и, выполнив горизонтальный разрез и отогнув внешние ткани, обнажите расположенную снизу мышцу. Следите за тем, чтобы инструменты не контактировали с контаминированной внешней поверхностью и, таким образом, не заражали подлежащую мышцу. Используя методы асептики, осторожно отрежьте фрагменты пораженной мышцы, приблизительно  $2 \text{ мм}^3$ , и поместите в чашку Петри, содержащую глюкозо-пептонный (GP) агар (смотрите Таблицу 4.1.) с пенициллином G ( $100 \text{ единиц мл}^{-1}$ ) и стрептомицином ( $100 \text{ мкг мл}^{-1}$ ). Запечатайте чашки, инкубируйте при комнатной температуре или при  $25^\circ\text{C}$  и ежедневно проверяйте. Периодически переносите появляющиеся верхушки гиф в свежие чашки с глюкозо-пептонным агаром с антибиотиками, пока не будут получены культуры, свободные от контаминации.

#### 4.3.1.2.1.2. Метод 2

Образцы поражений, расположенных на боку или хвосте рыбы длиной  $<20$  см, можно отобрать, разрезав рыбу на две части при помощи стерильного скальпеля и выполнив поперечный разрез по краю поражения. Фламбируйте скальпель, пока он не раскалится докрасна, и используйте его для того, чтобы простерилизовать обнаженную поверхность мышцы. При помощи скальпеля с небольшим лезвием вырежьте округлый фрагмент мышцы ( $2\text{--}4 \text{ мм}^3$ ) из-под поражения и поместите в чашку Петри с глюкозо-пептонной средой (смотрите Таблицу 4.1.) с содержанием  $100 \text{ единиц мл}^{-1}$  пенициллина G и  $100 \text{ мкг мл}^{-1}$  стрептомицина. Инструменты не должны контактировать с контаминированной внешней поверхностью рыбы. Инкубируйте инокулированные среды при температуре приблизительно  $25^\circ\text{C}$  и исследуйте под микроскопом (желательно, инвертированным микроскопом) в пределах 12 часов. Периодически переносите появляющиеся верхушки гиф в чашки с глюкозо-пептонной средой с содержанием  $12 \text{ г л}^{-1}$  технического агара,  $100 \text{ единиц мл}^{-1}$  пенициллина G и  $100 \text{ мкг мл}^{-1}$  стрептомицина до тех пор, пока не будут получены аксеничные культуры. Изолят оомицета также можно поддерживать при температуре  $25^\circ\text{C}$  на глюкозо-дрожжевом (GY) агаре (смотрите Таблицу 4.1.) и переносить в пробирку со свежим глюкозо-дрожжевым агаром каждые 1–2 недели (Hatai & Egusa, 1979).

#### 4.3.1.2.2. Идентификация *Aphanomyces invadans*

*Aphanomyces invadans* не продуцирует половых структур, и, таким образом, осуществлять диагностику только по морфологическим критериям не следует.

Однако оомицет можно идентифицировать вплоть до уровня рода, индуцируя спорогенез и демонстрируя типичные бесполое характеристики *Aphanomyces*, как описано у Lilley с соавт., 1998. Для *A. invadans* характерен медленный рост в культуре и отсутствие роста при 37°C на глюкозо-пептонном агаре с дрожжевым экстрактом (GPY) (Таблица 4.1.). Подробные профили соотношения роста и температуры представлены у Lilley & Roberts, 1997. Две процедуры, которые можно использовать для подтверждения присутствия *A. invadans* – это биопроба и амплификация рДНК *A. invadans* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

#### 4.3.1.2.3. Индуцирование споруляции в культурах *Aphanomyces invadans*

Индуцирование бесполой репродуктивных структур необходимо для идентификации культур оомицетов как относящихся к роду *Aphanomyces*. Чтобы индуцировать споруляцию, поместите агаровую «пробку» (диаметром 3–4 мм) активно растущего мицелия в чашку Петри, содержащую глюкозо-пептонный с дрожжевым экстрактом (GPY) бульон и инкубируйте в течение 4 дней при температуре приблизительно 20°C. Вымойте питательный агар из получившейся в результате массы путем последовательного переноса с использованием пяти чашек Петри, содержащих автоклавированную прудовую воду (Таблица 4.1.), и оставьте на ночь при температуре 20°C в автоклавированной прудовой воде. По прошествии примерно 12 часов под микроскопом должно быть видно формирование ахлиодных кластеров первичных цист и высвобождение подвижных вторичных зооспор.

#### 4.3.1.2.4. Биопроба

Можно произвести экспериментальное заражение рыб путем внутримышечного введения 0,1 мл суспензии 100+ подвижных зооспор рыбам, восприимчивым к инфекции *A. invadans* (предпочтительно *Channa striata* или другим восприимчивым видам), при температуре 20°C, и демонстрируя гистологический рост несептированных гиф, 12–25 мкм в диаметре, в мышце рыбы при отборе образцов по прошествии 7 дней и типичных грибковых гранулам в мышце рыбы при отборе образцов по прошествии 10–14 дней.

#### 4.3.1.2.5. Методы выявления антигенов с помощью антител

Поликлональные антитела к *A. invadans* или сапрофиту *Aphanomyces* продемонстрировали перекрестную реактивность друг к другу при использовании электрофореза белков в геле и анализа методом Вестерн-блота и иммуногистохимии. (Lilley с соавт., 1997b). Однако при помощи иммунофлуоресценции было установлено, что образовавшееся позже специфическое моноклональное антитело к *A. invadans* обладает высокой специфичностью и высокой чувствительностью к *A. invadans*. Это моноклональное антитело обеспечивало возможность выявления гиф *A. invadans* на ранней стадии инфекции (Miles с соавт., 2003).

#### 4.3.1.2.6. Молекулярные методы

#### 4.3.1.2.6.1. Амплификация ДНК *A. invadans* методом полимеразной цепной реакции

##### 4.3.1.2.6.1.1. Получение препарата ДНК из изолята *A. invadans*

ДНК экстрагируют из активно растущей колонии культуры *A. invadans* в глюкозно-дрожжевом (GY) бульоне примерно на четвертый день или когда молодой мицелий достигает 0,5–1,0 см в диаметре. Мицелий переносят в стерильные чашки Петри диаметром 100 мм, дважды промывают ФБР и затем помещают на тонкую оберточную бумагу для удаления жидкости. Верхушки гиф (~50–250 мг) отрезают стерильным лезвием скальпеля и переносят в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл для экстракции ДНК. Успешно применялись коммерческие наборы для экстракции ДНК (Phadee с соавт., 2004b; Vandersea с соавт., 2006).

##### 4.3.1.2.6.1.2. Получение препаратов ДНК из ткани, инфицированной *A. invadans*

Для экстракции ДНК подходят небольшие фрагменты инфицированной *A. invadans* ткани, 25–50 мг (Phadee с соавт., 2004a).

##### 4.3.1.2.6.1.3. Диагностика методом ПЦР

Три опубликованных метода являются специфичными для *A. Invadans*. Рекомендуется использовать ультрачистую воду для всех химических разведений в ПЦР-реакции.

###### 4.3.1.2.6.1.3.1. Метод 1

Сайт связывания видоспецифичного прямого праймера располагается около 3'-конца гена SSU (гена малой субъединицы), а сайт связывания видоспецифичного обратного праймера располагается в ITS1 регионе для *Ainvad-2F* (5'-ТСА-ТТГ-ТГА-ГТГ-ААА-СГГ-ТГ-3') и *Ainvad-ITSR1* (5'-GGC-TAA-GGT-TTC-AGT-ATG-TAG-3'). Смесь для ПЦР содержала 25 пМ каждого праймера, 2,5 мМ каждого дезоксинуклеозид трифосфата, 0,5 единицы ДНК-полимеразы Platinum *Taq* и 20 нг геномной ДНК (полученной либо из изолята *Aphanomyses*, либо из инфицированной ткани) для общего объема 50 мкл. Амплификацию ДНК осуществляют в термоциклере при следующих условиях проведения циклов: 2 минуты при 95°C; 35 циклов, каждый состоящий из 30 секунд при 95°C, 45 секунд при 56°C, 2,5 минут при 72°C; и финальная элонгация продолжительностью 5 минут при 72°C. Анализ продукта ПЦР осуществляют методом электрофореза в агарозном геле, а длина целевого продукта составляет 234 п.о. (Vandersea с соавт., 2006).

###### 4.3.1.2.6.1.3.2. Метод 2

Сайты связывания видоспецифичных праймеров располагаются в ITS1 и ITS2 регионах. Прямой праймер – ITS11 (5'-GCC-GAA-GTT-TCG-CAA-GAA-AC-3'), а обратный – ITS23 (5'-CGT-ATA-GAC-ACA-AGC-

АСА-ССА-3'). Смесь для ПЦР содержит 0,5 мкМ каждого праймера, 0,2 мМ каждого дезоксирибонуклеозид трифосфата, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,6 единицы ДНК-полимеразы *Taq* и 20 нг геномной ДНК (полученной из изолята *Aphanomyces*) для общего объема 25 мкл. Амплификацию ДНК осуществляют при следующих условиях проведения циклов: 5 минут при 94°C; 25 циклов, каждый состоящий из 30 секунд при 94°C, 30 секунд при 65°C, 1 минуты при 72°C; и финальная элонгация продолжительностью 5 минут при 72°C. Анализ продукта ПЦР осуществляют методом электрофореза в агарозном геле, а длина целевого продукта составляет 550 п.о. Амплификация методом ПЦР с использованием ДНК-матрицы, полученной из инфицированной ткани, сходна с приведенным выше протоколом за исключением того, что используется 5 нг ДНК-матрицы для проведения 35 циклов (Phadee с соавт., 2004b).

#### 4.3.1.2.6.1.3.3. Метод 3

Сайты связывания видоспецифичных праймеров располагаются в ITS1 и ITS2 регионах. Прямой праймер – В073 (5'-СТТ-GTG-СТГ-АГС-ТСА-САС-ТС-3'), а обратный – В0639 (5'-АСА-ССА-GAT-ТАС-АСТ-АТС-ТС-3'). Смесь для ПЦР содержит 0,6 мкМ каждого праймера, 0,2 мМ каждого дезоксирибонуклеозид трифосфата, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,625 единиц ДНК-полимеразы *Taq* и приблизительно 5 нг геномной ДНК (или 2,5 мкл ДНК-матрицы, экстрагированной из 25 мг инфицированной ткани и суспензированной в 100 мкл буфера) в 50 мкл объема реакционной смеси (Oidtmann с соавт., 2008). Амплификацию ДНК осуществляют при следующих условиях проведения циклов: 96°C в течение 5 минут; 35 циклов по 1 минуте при 96°C, 1 минуте при 58°C и 1 минуте при 72°C; финальная элонгация при 72°C в течение 5 минут (Oidtmann, в частной беседе). Анализ продукта ПЦР осуществляют методом электрофореза в агарозном геле, а длина целевого продукта составляет 564 п.о.

Все обнаруженные на сегодняшний день изоляты *A. invadans* относятся к единственному генотипу, и это облегчает идентификацию. В качестве альтернативного варианта можно провести секвенирование продуктов ПЦР и сравнить результаты с последовательностью, депонированной в общедоступных генетических банках данных. *Aphanomyces invadans* имеет характеристики, сходные с *A. astaci*, этиологическим возбудителем чумы ракообразных. Эти два патогенных оомицета можно дифференцировать, используя молекулярные инструменты (Diéguez-Uribeondo с соавт., 2009; Lilley с соавт., 2003; Phadee et al., 2004b; Vandersea с соавт., 2006).

#### 4.3.1.2.6.2. Метод флуоресцентной гибридизации *in-situ* (FISH) с пептидными нуклеиновыми кислотами

Метод флуоресцентной гибридизации *in-situ* (FISH) с пептидными

нуклеиновыми кислотами (ПНК) продемонстрировал высокую специфичность в отношении *A. invadans*. Метод обладает способностью напрямую обнаруживать мицелиеподобную структуру оомицета в тонких срезах тканей пораженных органов восприимчивых рыб. Меченый флуоресцеином (FLU) зонд, предназначенный для гибридизации с малой субъединицей рРНК *A. invadans* (п.о. 621-635; GenBank, инвентарный номер AF396684) – 5'-FLU-GTA-CTG-ACA-TTT-CGT-3' или Ainv-FLU3.

Пораженную ЭЯС ткань фиксируют и гибридизируют как можно скорее после отбора рыбы, чтобы свести к минимуму деградиацию РНК. Ткань (~20 мг) отсекают от наружного края поражений стерильными лезвиями скальпеля и помещают в отдельные лунки 24-луночного микротитрационного планшета. Один мл этанол-солевого фиксатора (44 мл 95% этанола, 10 мл деионизированной H<sub>2</sub>O и 6 мл 25 × SET буфера [3,75 М NaCl, 25 mM ЭДТА (этилендиаминтетрауксусной кислоты), 0,5 М Трис/HCl, pH 7,8]) с содержанием 3% полиоксиэтиленсорбитан монолаурата (Tween 20) добавляют для увеличения пермеабилзации ткани. Микротитрационный планшет бережно встряхивают при комнатной температуре на орбитальном шейкере (30 об/мин) в течение 1,5 часов. Фиксированные ткани промывают (два раза в течение 15 минут каждый) 0,5 мл гибридизационного буфера (5 × SET, 0,1% [об/об] Igepal-CA630 и 25 мкг мл<sup>-1</sup> поли[A]) с содержанием 3% Tween 20. Гибридизационный буфер удаляют, и ткани ресуспендируют в 0,5 мл гибридизационного буфера, содержащего 3% Tween 20 и 100 нМ зонда Ainv-FLU3. Контрольные образцы без зонда инкубируют с 0,5 мл гибридизационного буфера/3% Tween 20. Все ткани инкубируют при 60°C в течение 1 часа в темноте. После инкубации ткани промывают дважды с использованием 1 мл предварительно подогретого (60°C) 5 × SET буфера с содержанием 3% Tween 20 для удаления остаточного зонда. Образцы тканей монтируют на предметные стекла микроскопа с поли-L-лизинным покрытием. Одну каплю раствора, препятствующего выгоранию флуоресценции, наносят на образцы, которые затем накрывают покровным стеклом. Анализируют при помощи световой и эпифлуоресцентной микроскопии. Настройки камеры и микроскопа для анализов методом эпифлуоресценции сохраняют неизменными с тем, чтобы можно было провести сравнительные анализы относительной интенсивности флуоресценции между образцами с зондами и без зондов. Флуоресцирующие гифы оомицетов выглядят как зеленая флуоресценция на темном фоне ткани. Приведенные выше подробные протоколы опубликованы Vandersea с соавт., 2006. Применяя метод FISH, можно очень хорошо визуализировать *A. invadans* в тонких срезах тканей по сравнению с давленным препаратом нефиксированной ткани.

**Таблица 4.1.** Среды для выделения, роста и споруляции культур *Aphanomyces invadans*

Среда глюкозо-пептонная (GP)	Бульон глюкозо-пептонный с экстрактом дрожжей (GPY)	Агар глюкозо-пептонный с экстрактом дрожжей (GPY)	Агар глюкозо-дрожжевой (GY)	Автоклавированная прудовая вода
3 г литр <sup>-1</sup> глюкозы 1 г литр <sup>-1</sup> пептона 0,128 г литр <sup>-1</sup> MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0,014 г литр <sup>-1</sup> KН <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,029 г литр <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 2,4 мг литр <sup>-1</sup> FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O 1,8 мг литр <sup>-1</sup> MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O 3,9 мг литр <sup>-1</sup> CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O 0,4 мг литр <sup>-1</sup> ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	бульон GP + 0,5 г литр <sup>-1</sup> экстракта дрожжей	бульон GPY + 12 г литр <sup>-1</sup> технического агара	1% глюкозы, 0,25% экстракта дрожжей, 1,5% агара	Отберите образцы прудовой/озерной воды, которая, как известно, поддерживает рост оомицетов. Отфильтруйте через фильтровальную бумагу Whatman 541. Соедините одну часть прудовой воды с двумя частями дистиллированной воды и автоклавируйте. pH до 6–7.

#### 4.3.1.2.7. Очистка возбудителя

Необходимо поддерживать *A. invadans* в аксеничной культуре. Поскольку для него характерен медленный рост, он легко становится контаминированным другими микроорганизмами, такими как бактерии и другие быстрорастущие оомицеты и грибы. Попытки очистить или выделить *A. invadans* из контаминированных культур, как правило, оканчиваются неудачей.

#### 4.3.2. Серологические методы

Серологические методы для выявления и идентификации *A. invadans* с использованием больных рыб в качестве образцов не практичны. В случае необходимости, моноклональное антитело обеспечивает более высокую специфичность и чувствительность, чем поликлональное антитело, для выявления или идентификации *A. invadans* серологическими методами у больных особей или в изолятах патогена.

### 5. Рейтинг тестов в зависимости от цели использования

Имеющиеся в настоящее время методы для использования в целях надзора, выявления и диагностики инфекции *A. invadans* перечислены в таблице 5.1. Обозначения, использованные в таблице, означают: a = данный метод является методом, рекомендованным по причинам доступности, целесообразности и диагностической специфичности и чувствительности; b = данный метод является стандартным методом с хорошей диагностической чувствительностью и специфичностью; c = данный метод применяется в некоторых ситуациях, однако затраты, точность или другие факторы сильно ограничивают его применение; и d = данный метод в настоящее время не рекомендуется для данной цели. Данные обозначения в некоторой степени субъективны, поскольку пригодность включает в себя такие аспекты, как достоверность, чувствительность, специфичность и целесообразность. Хотя не все из тестов,

перечисленных как относящиеся к категории а или b, прошли официальную стандартизацию и валидацию, их рутинный характер и тот факт, что они уже широко используются, не давая при этом вызывающих сомнение результатов, делают их приемлемыми.

**Таблица 5.1. Методы для целевого надзора и диагностики**

Метод	Целевой надзор			Предварительная диагностика	Подтверждающая диагностика
	Мальки рыб	Молодь	Взрослые особи		
Макроскопические признаки	c	c	c	b	c
Прямая СМ; наблюдение гифов оомицетов в тканях, давленных препаратах нефиксированных тканей	d	d	d	b	b
FISH; наблюдение гифов оомицетов в тканях	d	d	d	a	a
Гистопатология	c	c	c	a	a
Выделение <i>A. invadans</i> и подтверждающая идентификация посредством биопробы или ПЦР	d	d	d	a	a
ПЦР с использованием экстрактов из тканей	d	d	d	a	a
Анализ последовательностей	d	d	d	d	a
Трансмиссионная ЭМ тканей	d	d	d	d	d

СМ = световая микроскопия; FISH = флуоресцентная гибридизация *in situ* с пептидными нуклеиновыми кислотами; ПЦР = полимеразная цепная реакция; ЭМ = электронная микроскопия.

## **6. Тест(ы), рекомендуемые для целевого надзора для объявления свободы от инфекции *Aphanomyces invadans***

Тест для целевого надзора для объявления свободы от инфекции *A. invadans* – это исследование макроскопических признаков. Целевой надзор осуществляется дважды в год для того, чтобы охватить весь диапазон сезонных изменений, по меньшей мере, один раз в течение времени года, благоприятного для возникновения инфекции *A. invadans*, или когда показатели температуры воды находятся на уровне около 18–25°C. Необходимо применять меры биозащиты для поддержания статуса свободы от болезни на контролируемых аквакультурных объектах или компартментах.

При использовании теста по макроскопическим признакам для целевого надзора, необходимо исследовать большое количество рыб, не умерщвляя их. Отбор рыб в качестве образцов на фермах, в компартментах или в природных водоемах следует осуществлять бережно, используя подходящие снасти или сети. Надлежащее количество

исследуемых особей рыб должно быть основано на подробной информации, приведенной в *Руководстве МЭБ по надзору за здоровьем водных животных* (2009).

Когда рыбы демонстрируют макроскопические признаки, сходные с инфекцией *A. invadans*, их следует категоризировать как подозрительных рыб, и данное место/ферму/компартмент/зону следует считать подозрительными. Подозрительных особей следует подвергнуть дальнейшему тестированию, используя методы, перечисленные в рамках предварительной диагностики, с последующей подтверждающей диагностикой, согласно указанному в Таблице 5.1.

## **7. Критерии подтверждающей диагностики**

### **7.1. Дефиниция подозрительного случая**

Положительный результат, полученный при помощи любого из диагностических методов, описанных в Разделе 4, следует считать подозрительным.

### **7.2. Дефиниция подтвержденного случая**

У восприимчивых видов в пределах известного географического диапазона инфекции *A. invadans* подтвержденным случаем инфекции *A. invadans* является положительный результат, когда при гистопатологическом исследовании наблюдаются микотические гранулемы.

У других видов-хозяев или за пределами известного диапазона *A. invadans* рекомендуется подтверждение посредством гистопатологического исследования и ПЦР.

## **8. Список литературы**

BALDOCK F.C., BLAZER V.S., CALLINAN R.B., HATAI K., KARUNASAGAR I., MOHAN C.V. & BONDAD-REANTASO M.G. (2005). Outcomes of a short expert consultation on epizootic ulcerative syndrome (EUS): Re-examination of causal factors, case definition and nomenclature. In: Diseases in Asian Aquaculture V. Walker P., Laster R. & Bondad-Reantaso M.G., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 555– 585.

BALASURIYA L.K.S.W. (1994). Epizootic ulcerative syndrome in fish in Sri Lanka, country status report. In: Proceeding of the ODA Regional Seminar on Epizootic Ulcerative. Robert R.J., Campbell B. & MacRae I.H., eds. Aquatic Animal Health Research Institute, Bangkok, Thailand, 39–47.

BLAZER V.S., VOGELBEIN W.K., DENSMORE C.L., MAY E.B., LILLEY J.H. & ZWERNER D.E. (1999). *Aphanomyces* as a cause of ulcerative skin lesions of menhaden from Chesapeake Bay tributaries. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 340– 349.

BONDAD-REANTASO M.G., LUMANLAN S.C., NATIVIDAD J.M. & PHILLIPS M.J. (1992). Environmental monitoring of the epizootic ulcerative syndrome (EUS) in fish from Munoz, Nueva Ecija in the Philippines. In: Diseases in Asian Aquaculture 1. Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 475–490.

CATAP E.S. & MUNDAY B.L. (1998). Effects of variations of water temperature and dietary lipids on the expression of experimental epizootic ulcerative syndrome (EUS) in sand whiting, *Sillago ciliata*. *Fish Pathol.*, **33**, 327–335.

CHINABUT S. & ROBERTS R.J. (1999). Pathology and Histopathology of Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS). Aquatic Animal Health Research Institute, Department of Fisheries, Royal Thai Government, Bangkok, Thailand, 33 pp (ISBN 974-7604-55-8).

CHINABUT S., ROBERTS R.J., WILLOUGHBY G.R. & PEARSON M.D. (1995). Histopathology of snakehead, *Channa striatus* (Bloch), experimentally infected with the specific *Aphanomyces* fungus associated with epizootic ulcerative syndrome (EUS) at different temperatures. *J. Fish Dis.*, **18**, 41–47.

DIÉGUEZ-URIBEONDO J., GARCIA M.A., CERENIUS L., KOZUBÍKOVÁ E., BALLESTEROS I., WINDELS C., WEILAND J., KATOR H., SÖDERHÄLL K. & MARTÍN M.P. (2009). Phylogenetic relationships among plant and animal parasites, and saprotrophs in *Aphanomyces* (Oomycetes). *Fungal Genetics and Biology*, **46**, 365–376.

EGUSA S. & MASUDA N. (1971). A new fungal disease of *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathol.*, **6**, 41–46.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2009). Report of the international emergency disease investigation task force on a serious fish disease in Southern Africa, 18–26 May 2007. FAO, Rome, Italy, 70 pp.

FRASER G.C., CALLINAN R.B. & CALDER L.M. (1992). *Aphanomyces* species associated with red spot disease: an ulcerative disease of estuarine fish from eastern Australia. *J. Fish Dis.*, **15**, 173–181.

HATAI K. & EGUSA S. (1979). Studies on pathogenic fungus of mycotic granulomatosis III. Development of the medium for MG-fungus. *Fish Pathol.*, **13**, 147–152.

HATAI K., EGUSA S., TAKAHASHI S. & OOE K. (1977). Study on the pathogenic fungus of mycotic granulomatosis – I. Isolation and pathogenicity of the fungus from cultured-ayu infected with the disease. *Fish Pathol.*, **12**, 129–133.

HATAI K., NAKAMURA K., AN RHA S., YUASA K. & WADA S. (1994). *Aphanomyces* infection in dwarf gourami (*Colisa lalia*). *Fish Pathol.*, **29**, 95–99.

KHAN M.H., MARSHALL L., THOMPSON K.D., CAMPBELL R.E. & LILLEY J.H. (1998). Susceptibility of five fish species (Nile tilapia, rosy barb, rainbow trout, stickleback and roach) to intramuscular injection with the *Oomycete* fish pathogen, *Aphanomyces invadans*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **18**, 192–197.

LILLEY J.H., CALLINAN R.B., CHINABUT S., KANCHANAKHAN S., MACRAE I.H. & PHILLIPS M.J. (1998). Epizootic ulcerative syndrome (EUS) technical handbook. Aquatic Animal Health Research Institute., Bangkok, Thailand, 88 pp.

LILLEY J.H., HART D., PANYAWACHIRA V., KANCHANAKHAN S., CHINABUT S., SÖDERHÄLL K. & CERENIUS L. (2003). Molecular characterization of the fish-pathogenic fungus *Aphanomyces invadans*. *J. Fish Dis*, **26**, 263–275.

LILLEY J.H., HART D., RICHARDS R.H., ROBERTS R.J., CERENIUS L. & SÖDERHÄLL K. (1997a). Pan-Asian spread of single fungal clone results in large scale fish kills. *Vet. Rec.*, **140**, 653–654.

LILLEY J.H., PETCHINDA T. & PANYAWACHIRA V. (2001). *Aphanomyces invadans* zoospore physiology: 4. *In vitro* viability of cysts. *The AAHRI Newsletter*, **10**, 1–4.

LILLEY J.H. & ROBERTS R.J. (1997). Pathogenicity and culture studies comparing the *Aphanomyces* involved in epizootic ulcerative syndrome (EUS) with other similar fungi *J. Fish Dis.*, **20**, 135–144.

LILLEY J.H., THOMPSON K.D. & ADAMS A. (1997b). Characterization of *Aphanomyces invadans* by electrophoretic and Western blot analysis. *Dis. Aquat. Org.*, **30**, 187–197.

LUMANLAN-MAYO S.C., CALLINAN R.B., PACLIBARE J.O., CATAP E.S. & FRASER G.C. (1997). Epizootic ulcerative syndrome (EUS) in rice-fish culture systems: an overview of field experiments 1993-1995. *In: Diseases in Asian Aquaculture III*. Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 129–138.

MCKENZIE R.A. & HALL W.T.K. (1976). Dermal ulceration of mullet (*Mugil cephalus*). *Aust. Vet. J.*, **52**, 230–231.

MILES D.J.C., POLCHANA J., LILLEY J.H., KANCHANAKHAN S., THOMPSON K.D. & ADAMS A. (2001). Immunostimulation of striped snakehead *Channa striata* against epizootic ulcerative syndrome. *Aquaculture*, **195**, 1–15.

MILES D.J.C., THOMPSON K.D., LILLEY J.H. & ADAMS A. (2003). Immunofluorescence of the epizootic ulcerative syndrome pathogen, *Aphanomyces invadans*, using a monoclonal antibody. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 77–84.

OIDTMANN B., STEINBAUER GEIGER S. & HOFFMANN R.W. (2008). Experimental infection and detection of *Aphanomyces invadans* in European catfish, rainbow trout and European eel. *Dis. Aquat. Org.*, **82**, 185–207.

PHADEE P., KURATA O. & HATAI K. (2004a). A PCR method for the detection of *Aphanomyces piscicida*. *Fish Pathol.*, **39**, 25–31.

PHADEE P., KURATA O., HATAI K., HIRONO I. & AOKI T. (2004b). Detection and identification of fish-pathogenic *Aphanomyces piscicida* using polymerase chain reaction (PCR) with species-specific primers. *J. Aquat. Anim. Health*, **16**, 220–230.

PRADHAN P.K., MOHAN C.V., SHANKAR K.M., KUMAR B.M. & DEVARAJA G. (2007). Yearlings of Indian major carps resist infection against the epizootic ulcerative syndrome pathogen, *Aphanomyces invadans*. *Current Science*, **92**, 1430–1434.

THOMPSON K.D., LILLEY J.H., CHINABUT S. & ADAMS A. (1997). The antibody response of snakehead, *Channa striata* Bloch, to *Aphanomyces invadans*. *Fish & Shellfish Immunology*, **7**, 349–353.

TONGUTHAI K. (1985). A preliminary account of ulcerative fish diseases in the Indo-Pacific region (a comprehensive study based on Thai experiences). National Inland Fisheries Institute, Bangkok, Thailand, 39 pp.

VANDERSEA M.W., LITAKER R.W., YONNISH B., SOSA E., LANDSBERG J.H., PULLINGER C., MOON-BUTZIN P., GREEN J., MORRIS J.A., KATOR H., NOGA E.J. & TESTER P.A. (2006). Molecular assays for detecting *Aphanomyces invadans* in ulcerative mycotic fish lesions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 1551–1557.

WADA S., AN RHA S., KONDOH T., SUDA H., HATAI K. & ISHII H. (1996). Histopathological comparison between ayu and carp artificially infected with *Aphanomyces piscicida*. *Fish Pathol.*, **31**, 71–80.

WILLOUGHBY L.G. & ROBERTS R.J. (1994). Improved methodology for isolation of the *Aphanomyces* fungal pathogen of epizootic ulcerative syndrome (EUS) in Asian fish. *J. Fish Dis.*, **17**, 541–543.

\*

\* \*

**NB:** В настоящее время нет Референтной лаборатории МЭБ по инфекции *A. invadans* (см. Таблицу в конце данного *Руководства по водным животным* или см. актуальный список на веб-сайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).